9 月 September
2019, 62(9): 1054 - 1064
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2019. 09. 006

囊状幼虫病病毒侵染对中华蜜蜂营养和免疫反应的影响

郑彬悦, 赵必安, 金　鑫, 段辛乐, 黄少康, 李江红*

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350002)

摘要:【目的】囊状幼虫病病毒(sacbrood virus, SBV)是严重危害中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蜂群健康和种群数量的病原微生物,但其对蜜蜂的致死机制不明。本研究旨在探究 SBV 对不同发育阶段中华蜜蜂营养代谢和免疫的影响。【方法】分别给中华蜜蜂 2 日龄幼虫和新羽化成虫饲喂 SBV,逐日统计死亡蜜蜂数量,检测病毒对蜜蜂存活的影响;利用 qPCR 检测中华蜜蜂 4 日龄幼虫、预蛹以及 10 和 20 日龄成虫体内 SBV RNA、营养代谢基因(*ilp*1, *ilp*2, *hex*110, *hex70b*, *hex70c* 和 *vg*)、先天性病毒免疫基因(*rel*, *toll*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin*, *hymenoptaecin*, *jra*, *key* 和 *state92e*)、细胞凋亡基因(*atg*7 和 *LOC*100577876)和抗 RNA 病毒基因(*dis*3 和 *dicer*)的表达水平。【结果】SBV 感染显著降低了中华蜜蜂幼虫的存活率,但对成虫的生存影响不明显。SBV RNA 在中华蜜蜂 4 日龄幼虫和预蛹体内的表达量显著高于其在 10 和 20 日龄成虫体内的表达量。SBV 显著降低了中华蜜蜂幼虫营养代谢基因 *ilp*1, *ilp*2, *hex*110, *hex70b* 和 *hex70c* 以及成虫营养代谢基因 *vg* 和 *hex*110 的表达量,但显著提高了 4 日龄幼虫 *rel*, *toll*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin*, *hymenoptaecin* 和 *jra* 以及成虫 *key* 和 *state92e* 等先天性病毒免疫基因的表达量,还引起预蛹体内的细胞凋亡基因 *atg*7 和 *LOC*100577876 的表达量显著增加。【结论】SBV 在中华蜜蜂幼虫和预蛹体内的感染水平远高于在成虫体内的,其对幼虫的危害也大于对成虫。SBV 显著影响了中华蜜蜂正常的营养代谢,染毒中华蜜蜂能够提高自身的免疫水平来应对;预蛹期中华蜜蜂幼虫细胞凋亡水平的显著增加可能与化蛹异常及死亡有关。

关键词: 中华蜜蜂; 囊状幼虫病病毒; 营养; 免疫; 寿命

中图分类号: S985.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2019)09-1054-11

Effect of *Sacbrood virus* infection on nutritional and immune responses of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

ZHENG Bin-Yue, ZHAO Bi-An, JIN Xin, DUAN Xin-Le, HUANG Shao-Kang, LI Jiang-Hong*

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】Sacbrood virus (SBV), is a pathogen seriously threatening the health and colony number of the Eastern honey bee, *Apis cerana cerana*. But its lethal mechanism is not clear so far. The aim of the study is to uncover the effect of SBV on nutrition and immunity in *A. cerana cerana* in different developmental stages.【Methods】The 2-day-old larvae and newly emerged adults of *A. cerana cerana* were fed with SBV, and the number of daily dead larvae or adults were recorded to determine the effect of SBV on the survival of larvae and adults, respectively. Moreover, the expression levels of SBV RNA, nutrient metabolism-related genes including *ilp*1, *ilp*2, *hex*110, *hex70b*, *hex70c* and *vg*, innate virus

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472156)

作者简介: 郑彬悦, 女, 1993 年生, 河南太康人, 硕士研究生, 研究方向为蜂学, E-mail: 774732579@ qq. com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: leejh@ fafu. edu. cn

收稿日期 Received: 2019-03-08; 接受日期 Accepted: 2019-07-10

immunity genes including *rel*, *toll*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin*, *hymenoptaecin*, *jra*, *key* and *state92e*, apoptosis genes including *atg*7 and *LOC*100577876, and anti-RNA virus genes including *dis*3 and *dicer* in 4-day-old larvae, prepupae, and 10- and 20-day-old adults of *A. cerana cerana* were determined by qPCR, respectively. 【Results】SBV significantly decreased the survival rate of *A. cerana cerana* larvae, but had no effect on the survival of adults. The expression levels of SBV RNA in 4-day-old larvae and prepupae were significantly higher than those in 10- and 20-day-old adults of *A. cerana cerana*. SBV significantly decreased the expression levels of the nutrient metabolism-related genes *ilp*1, *ilp*2, *hex*110, *hex70b* and *hex70c* in larvae, and *vg* and *hex*110 in adults, but significantly increased the expression levels of the innate virus immunity genes *rel*, *toll*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin*, *hymenoptaecin* and *jra* in 4-day-old larvae, and *key* and *state92e* in adults, and also the expression levels of the apoptosis genes *atg*7 and *LOC*100577876 in prepupae of *A. cerana cerana*. 【Conclusion】SBV has higher infection level in larvae and prepupae of *A. cerana cerana* than in adults, with higher virility to larvae than to adults. SBV decreases the nutrient metabolism of *A. cerana cerana*. Infected honeybees try to cope with the virus infection through increasing the immunity level. The increasing of apoptosis level in the prepupa might be related with the larval death and abnormal prepupal development.

Key words: *Apis cerana cerana*; *Sacbrood virus*; nutrition; immunity; life span

蜜蜂是重要的授粉昆虫。但过去的十几年,世界范围内的蜜蜂因各种原因大量损失,严重威胁到养蜂生产、生态环境平衡和各国的农业生产(Aizen and Harder, 2009; Levy, 2011)。如何减少蜂群损失已经成为世界各国政府和科学家关注的重要问题和面临的一项重要任务(Potts *et al*., 2010, 2016; Levy, 2011)。

病毒分布广泛,据报道,在蜜蜂体内能够检测到的病毒有 30 余种(Galbraith *et al*., 2018),一般都是正链 RNA 病毒,在复制的过程中因为没有校对机制,很容易发生变异,极易发展形成具有高侵染能力和毒性的菌株,给蜜蜂的生存发展带来危害(Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005)。蜜蜂病毒侵染蜜蜂幼虫或成虫,影响蜜蜂的生长发育、寿命和行为,进而影响到蜂群的生长和生产能力(Chen and Siede, 2007; Tantillo *et al*., 2015; McMahon *et al*., 2016; Natsopoulou *et al*., 2017)。囊状幼虫病病毒(sacbrood virus, SBV)最早在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 体内报道,但对包括中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 在内的东方蜜蜂 *Apis cerana* 危害更严重(White, 1913, Shan *et al*., 2017)。其主要侵染蜜蜂的幼虫并在体内大量繁殖,使其不能正常化蛹,只剩下幼虫外皮包裹下的充满病毒粒子的囊状幼虫(Bailey, 1964)。危害严重时,蜂群大量的幼虫因被感染而死亡,最终导致蜂群灭亡。成虫因为清理染病死亡的幼虫被侵染,感染 SBV 的成虫无明显的症状,但会缩短成虫寿命(Chen and Siede, 2007)。据报道囊状幼虫病病毒曾经先后对分布在泰国、韩国、日本和中国中华蜜蜂在内的东方蜜蜂种群及其养殖业带来近乎毁灭性的打击(Bailey *et al*., 1982; Rana *et al*., 1986; Verma *et al*., 1990; Zhang *et al*., 2001; Ma *et al*., 2011; Choe *et al*., 2012; Nguyen and Le, 2013; Rao, 2016),目前依然是危害东方蜜蜂生存的主要病原因子。

中华蜜蜂是我国的特有蜜蜂资源,广泛分布于全国除新疆之外的所有地区。我国目前中华蜜蜂的蜂群饲养数量约在 350 万群,是我国养蜂业不可分割的组成部分(国家蜂产业技术体系, 2016)。因其抗寒性较强,对山区以及冬季开花植物的繁衍和农业生产不可替代。中华蜜蜂的生存也受到多种病原微生物的危害,其中由囊状幼虫病病毒引起的囊状幼虫病是威胁中华蜜蜂生存的主要疾病之一。

蜜蜂与果蝇同属无脊椎动物,它们具备相似的免疫系统和机制(Brutscher *et al*., 2015; Doublet *et al*., 2017; McMenamin *et al*., 2018),包括营养、免疫在内的多数编码基因可在彼此的基因组上对应找到,这为研究蜜蜂应对 SBV 侵染的机制提供了良好的基础。蜜蜂是全变态昆虫,其发育历经卵、幼虫、蛹和成蜂 4 个阶段,它们在营养调控和免疫机制等方面有较大的差别,因而对病原微生物侵染的敏感性和抵抗能力也不同。为探究 SBV 对中华蜜蜂的影响,本研究分别对中华蜜蜂的幼虫和新羽化成虫人工饲喂 SBV 病毒,研究其对蜜蜂幼虫和成虫在营养、免疫以及寿命的影响,研究结果可为 SBV 侵染、

蜜蜂防御机制及相关疾病防控等方面的研究和应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

本研究的中华蜜蜂样本采自于福建农林大学蜂学学院院教学科研蜂场饲养的蜂群，经 RT-PCR 检测后，以无 SBV 感染的蜂群作为蜜蜂样本采集蜂群。

1.2 主要试剂和仪器

TRIzol® 试剂购于 Invitrogen 公司；反转录 cDNA 第 1 条链合成试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription System 购自 Promega 公司；qPCR 试剂盒 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司；异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷等药品购自国药集团化学试剂有限公司。荧光定量 PCR 仪为 Applied Biosystems 的 QuantStudio 6 系统。

1.3 SBV 病毒液制备

从感染 SBV 的蜂群内采集典型的尖头患病幼虫，每头染病幼虫加 500 μL PBS 缓冲液，12 000 g 离心 10 min，收集上清液作为接种用的 SBV 病毒液。利用已报道的引物序列通过荧光定量 PCR 检测病毒浓度为 1.0E + 12 拷贝数/mL（林丽花等，2016）。同时利用报道方法（Sguazza *et al.*, 2013）检测其他蜜蜂常见病毒，未受其他病毒感染的 SBV 样本用于后续接种试验。

1.4 SBV 病毒侵染及中华蜜蜂存活率的检测

试验蜂群内加入无幼虫的巢脾，供蜂王产卵 6 h，然后将其用隔王板隔开避免蜂王持续在巢脾产卵。105 h 后，用移虫针将孵化的 2 日龄幼虫移至 48 孔板内。试验组和对照组各设 3 个重复，试验组饲喂含有 SBV 病毒的蜜蜂幼虫饲料[蜂王浆，50%（v/v）；葡萄糖 6%（w/v），果糖 6%（w/v），酵母粉 1%（w/v），1.3 节制备的 SBV 病毒液 20%（v/v）]，对照组饲喂用 PBS 代替病毒液配制的饲料，置于 34.5℃，RH > 90% 黑暗的培养箱内 24 h（2 日龄幼虫 24 h 取食约 10 μL，幼虫实际病毒摄入量约为 2 μL）。此后，每日幼虫饲喂不含 SBV 病毒的新鲜饲料并逐日统计蜜蜂幼虫的死亡数。当幼虫发育至 4 日龄和 7 日龄（预蛹期）时，试验组和对照组每板各取 4 头蜜蜂幼虫样本，单独存于 1.5 mL 离心管内，置于 –80℃保存备用。

从 1.1 节试验蜂群中挑选出有新羽化蜜蜂出房的巢脾置于室内恒温恒湿培养箱（32.5℃，50% RH）中饲养过夜，12 h 后收集新羽化成虫置于相同条件的培养箱内饥饿处理 2 h，实验组每头成虫饲喂含 2 μL SBV 病毒液的 50% 糖水 5.0 μL；对照组每头成虫饲喂 50% 糖水 5.0 μL。各组成虫分别装入饲养盒，每盒 100 头，提供 50%（w/v）糖水和花粉团，实验组及对照组各 3 组重复，置于 30.0℃，50% RH 条件下饲养。饲喂期间每天更换糖水，清理掉笼中的死亡蜜蜂尸体，并记录下各饲养盒内蜜蜂的死亡数用于存活率分析。在饲养至 10 和 20 d 时，从实验组、对照组的每饲养盒分别取 4 头样本，置于液氮内速冻后置于 –80℃冰箱储存备用。

1.5 RNA 提取与 cDNA 合成

按照试剂盒说明用TRIzol® 试剂提取 1.4 节 –80℃保存的幼虫和成虫的总 RNA，用 50 μL 含有 RNA 酶抑制剂的水溶解，紫外分光光度计测 RNA 溶液的浓度及质量。合格 RNA 样本置于 –80℃备用；cDNA 第 1 链的合成参照试剂盒说明书进行，置于 –20℃备用。

1.6 qPCR 检测 SBV 侵染后中华蜜蜂体内 SBV RNA 及营养代谢和免疫相关基因的表达

蜜蜂与果蝇具有类似的免疫机制（Evans *et al.*, 2006），作为模式生物的果蝇其病毒免疫机制比较清楚，包括先天性免疫、细胞凋亡和抗病毒等机制都发挥了作用，这对研究蜜蜂病毒免疫机制有参考价值。本研究根据果蝇的这些免疫基因，在蜜蜂基因组内比对寻找到对应的 19 个同源病毒免疫基因，包括 6 个营养代谢基因、9 个先天性病毒免疫基因、2 个细胞凋亡基因和 2 个抗 RNA 病毒基因。然后查阅文献，引用已报道的 qPCR 定量引物，或者根据这些蜜蜂基因序列，利用 NCBI 引物设计软件在线设计（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/），相关引物具体信息见表 1。基于 SBV RNA 表达量检测中华蜜蜂体内 SBV 含量，内参基因 *β-actin*，引物序列见表 1。所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系：PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix（2×）10.0 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，1.5 节合成的 cDNA 模板 1.0 μL，ddH_2O 8.0 μL。反应条件：50℃ UDG 激活 2 min；95℃预变性 2 min，95℃变性 15 s，56℃退火 15 s，72℃延伸 60 s，40 个循环；溶解曲线阶段：95℃ 15 s，60℃ 60 s，95℃ 15 s，80 个循环。

表 1　qPCR 所用引物信息
Table 1　Primers used for qPCR

基因 Gene	基因登录号 Gene ID	引物序列(5′-3′) Primer sequences	Tm (℃)	参考文献 References
内参基因 Reference gene				
β-actin	NM_001185145.1	F：TTGTATGCCAACACTGTCCTTT R：TGGCGCGATGATCTTAATTT	59	Simone *et al*., 2009
病毒 RNA Virus RNA				
SBV	NC_002066.1	F：TATTCAGGGGGACGCTACAC R：GCGTGAGTTGACAGAAAATC	59	林丽花等，2016
营养代谢基因 Nutrient metabolism-related genes				
*ilp*1	XM_026442143.1	F：CGATAGTCCTGGTCGGTTTG R：CAAGCTGAGCATAGCTGCAC	59	de Azevedo and Hartfelder, 2008
*ilp*2	NM_001177903.1	F：TTCCAGAAATGGAGATGGATG R：TAGGAGCGCAACTCCTCTGT	59	de Azevedo and Hartfelder, 2008
*hex*110	NM_001101023.1	F：ACGGACAATACCCGAACACC R：AGCATGCTGATGCCTCTGTT	59	本文 This study
hex70b	NM_001011600.1	F：AACAGCCACGAATCCGTCTT R：CAGGCTTGTCCAGAGGGAAG	59	本文 This study
hex70c	NM_001098717.1	F：TAAGGCAGGCAGACTTGAGC R：AAACGCTGTGGTGAACATGC	59	本文 This study
vg	NM_001011578.1	F：TCGACAACTGCGATCAAAGGA R：TGGTCACCGACGATTGGATG	59	Schwarzet *et al*., 2016
先天性病毒免疫基因 Innate virus immunity genes				
rel	XM_026444177.1	F：TTCCTGAAGCTGGTGCATGT R：CCTGCTTTTGCTGCAAGATGT	59	本文 This study
toll	XM_016911914.1	F：CAAATCGCGCGTTCTGTTGA R：TCTGCGTTCACTGAGTGCTT	59	本文 This study
apidaecin	NM_001011613.1	F：TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG R：GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT	59	Evans *et al*., 2006
abaecin	NM_001011617.1	F：CAGCATTCGCATACGTACCA R：GACCAGGAAACGTTGGAAAC	59	Simone *et al*., 2009
defensin	NM_001011616.2	F：TGCGCTGCTAACTGTCTCAG R：AATGGCACTTAACCGAAACG	59	Simone *et al*., 2009
hymenoptaecin	NM_001011615.1	F：CTCTTCTGTGCCGTTGCATA R：GCGTCTCCTGTCATTCCATT	59	Simone *et al*., 2009
jra	XM_003250988.3	F：AGGACCTATACCACCAGCGT R：CGTACAATTCTTGCGCCTCG	59	本文 This study
key	XM_001120619.4	F：TGCTGAACCAGAAAGCCACT R：TCTGCTGTATCCCATGATGCAA	59	本文 This study
state92e	XM_397181.6	F：TGGAGTCGGTGGACAAACAC R：CGTAGCTGGAAGCCACTGAT	59	本文 This study
细胞凋亡基因 Apoptosis genes				
*atg*7	XM_006564507.2	F：GGGTTGCACATCCTACTCCC R：GCCTGGATTGGAACTTGTGC	59	本文 This study
*LOC*100577876	XM_016912031.1	F：TCTGGCATTCCACTTTGCAC R：GCTATCTGGCCAGTTGGGAA	59	本文 This study
抗 RNA 病毒基因 Anti-RNA virus genes				
*dis*3	XM_006565646.2	F：TGTCCAAGCAGTTACGAAGACA R：AAGTCAACAGCAGCATCAGGA	59	本文 This study
dicer	XM_016917734.1	F：AGCAGTAGCTGATTGTGTGGA R：ATTTCAGAAGCGCAAGGCAT	59	本文 This study

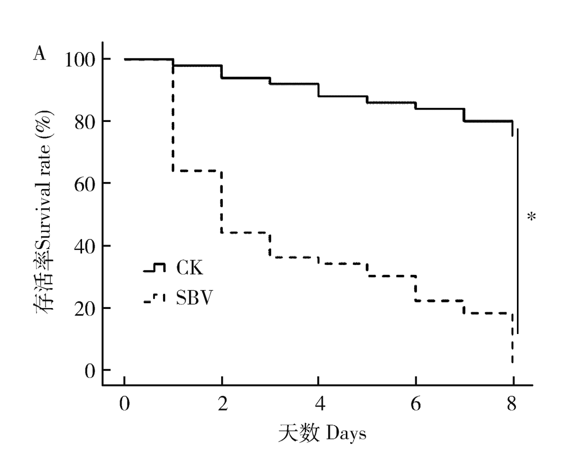
1.7　数据分析

qPCR 获得 C_T 值,以 *β-actin* 为内参基因进行样本间的标准化处理,再以标准化处理完后的对照组 C_T 的均值为参照,获得各目标基因的对应数值($-\Delta\Delta Ct$),在 SBV 接种和未接种的对照组之间的基因表达量的差异用独立样本 *T* 检验的方法检测差异显著性(SPSS Statistics 21.0);根据获得的对应样本中 SBV RNA 表达量的 $-\Delta\Delta Ct$ 数据,利用 One-way ANOVA 的方法分析不同日龄蜜蜂体内 SBV RNA 表达量的差异,在用 Levene 检验分析获得数据的方差齐性之后,采用 Tukey HSD(方差齐性时)或者 Dunnett T3(方差不齐时)的方法比较分析各日龄中华蜜蜂之间的病毒滴度的差异性。根据每天记录的蜜蜂死亡数,利用 Kaplan-Meier Method 来分析 SBV 处理组和对照组中华蜜蜂的存活率,用 Log Rank 方法分析两者之间存活率的差异性,显著差异水平为 $P<0.05$。

2　结果

2.1　SBV 病毒侵染后中华蜜蜂的存活曲线

由图 1 可知,接种 SBV 的中华蜜蜂幼虫死亡率随时间推移不断增加,且没有幼虫能够完成化蛹发育,与对照组蜜蜂幼虫相比,差异显著($\chi^2=69.244$, $P=0.000$)(图 1：A);但对于成虫而言,存活曲线显示处理组蜜蜂的存活率在 10 日龄后低于对照组,但统计分析表明差异不显著($\chi^2=0.562$, $P=0.453$)(图 1：B)。这表明,SBV 能够显著影响蜜蜂幼虫存活率,而对成虫的存活率无明显影响。



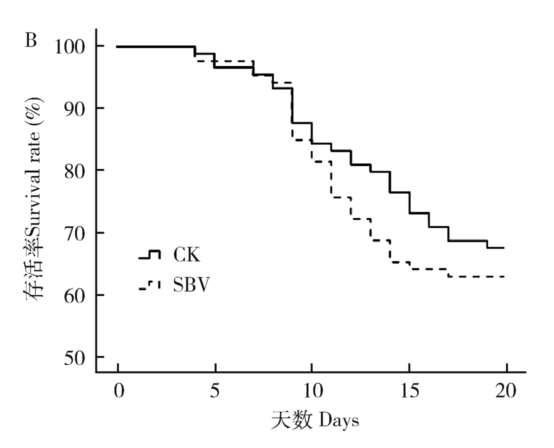


图 1　SBV 侵染后中华蜜蜂 2 日龄幼虫(A)和新羽化成虫(B)的存活曲线

Fig. 1　Survival curves of the 2-day-old larvae (A) and newly emerged adults (B) of *Apis cerana cerana* after infection with SBV

CK：正常饲喂不含 SBV 饲料的蜜蜂幼虫或者成虫 Larvae or adults fed with normal diet uninoculated with SBV; SBV：为饲喂含有 SBV 饲料的蜜蜂幼虫或者成虫 Larvae or adults fed with the diet inoculated with SBV. 下同 The same below. 存活率曲线利用 SPSS Statistics 21.0 内的 Kaplan-Meier 方法来制作。SBV 处理组和对照组蜜蜂之间存活率差异利用 Log Rank 方法进行分析,星号表示有差异显著($P<0.05$)。The survival curve was prepared by the method of Kaplan-Meier in SPSS Statistics 21.0. The difference in survival rate between the groups of SBV and CK was analyzed by the method of Log Rank, and the asterisk indicates significant difference ($P<0.05$).

2.2　感染病毒的中华蜜蜂体内 SBV RNA 相对表达量

对接种 SBV 的中华蜜蜂幼虫和新羽化的成虫在不同发育时间体内的 SBV RNA 相对表达量利用 qPCR 进行检测,结果表明 4 日龄幼虫($t=-6.544$, $P=0.000$)、处于变态发育的预蛹(7 日龄幼虫)($t=-6.235$, $P=0.000$)、10 日龄成虫($t=-3.759$, $P=0.002$)以及 20 日龄成虫($t=-2.881$, $P=0.012$)体内的 SBV RNA 相对表达量均显著高于对照组;其中幼虫体内病毒 SBV RNA 相对表达量显著高于成虫体内 SBV RNA 相对表达量(One-way ANOVA, $F=15.617$, $P=0.000$),相对表达量差异统计值分别为 $P=0.002$ 和 $P=0.0001$,预蛹与 10 和 20 日龄成虫之间的差异统计值分别为 $P=0.000$ 和 $P=0.000$)(图 2)。而在取食期的 4 日龄幼虫和预蛹体内 SBV RNA 相对表达量差异不显著($P=0.885$),10 日龄以及 20 日龄成虫之间 SBV RNA 相对表达量差异也不显著($P=0.947$)。所以,SBV 可以在各发育阶段的蜜蜂体内繁殖,但其在幼虫体内的相对表达量显著高于成虫的。

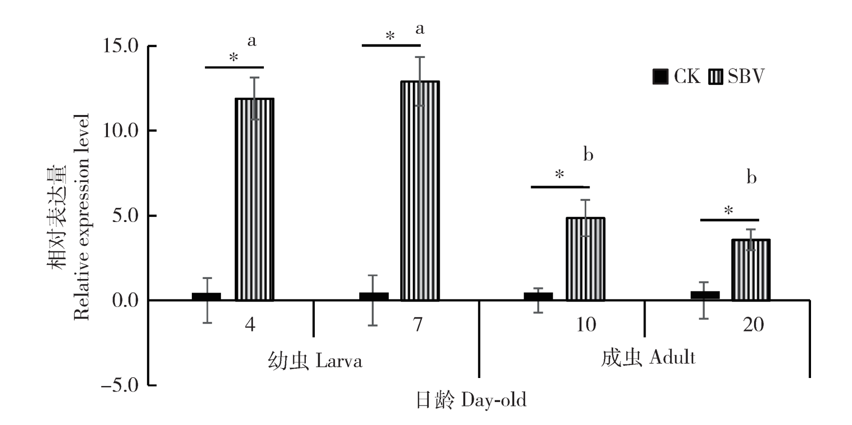


图 2　不同发育时期中华蜜蜂体内的 SBV RNA 相对表达量

Fig. 2　Relative expression level of SBV RNA in different developmental stages of *Apis cerana cerana*

7 日龄幼虫表示预蛹。图中数据以平均值 ± 标准误的形式表示。星号表示 SBV RNA 表达量在 SBV 组与对照之间差异显著($P<0.05$, T 检验)；柱上不同小写字母表示不同发育时期的 SBV RNA 表达量差异显著($P<0.05$, One-way ANOVA)。Seven-day-old larva is prepupa. Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisk indicates significant difference in the expression level of SBV RNA between the SBV group and the control (CK) ($P<0.05$, *T*-test). Different lowercase letters above bars indicate significant difference in the expression level of SBV RNA among different developmental stages ($P<0.05$, One-way ANOVA).

2.3　SBV 病毒侵染后中华蜜蜂营养代谢、先天性病毒免疫、细胞凋亡和抗 RNA 病毒相关基因的表达变化

与对照组相比,处理组 4 日龄幼虫营养代谢基因 *ilp*1($t=3.029$, $P=0.006$), *ilp*2($t=2.208$, $P=0.039$), *hex*110($t=2.585$, $P=0.017$), *hex70b* ($t=3.407$, $P=0.003$)和 *hex70c* ($t=3.119$, $P=0.005$)的表达量显著下降(图 3：A)。但先天性病毒免疫基因 *rel* ($t=-2.731$, $P=0.012$), *toll* ($t=-2.412$, $P=0.025$), *apidaecin* ($t=-3.200$, $P=0.004$), *abaecin* ($t=-3.093$, $P=0.005$), *defensin* ($t=-3.702$, $P=0.001$), *hymenoptaecin* ($t=-5.344$, $P<0.001$)和 *jra* ($t=-2.707$, $P=0.013$)的表达量则显著增加；细胞凋亡基因 *atg*7 ($t=-0.374$, $P=0.713$)和 *LOC*100577876 ($t=0.738$, $P=0.469$),以及抗 RNA 病毒基因 *dis*3 ($t=-0.414$, $P=0.683$)和 *dicer* ($t=-1.607$, $P=0.125$)的表达未受显著影响(图 3：B)。因此,SBV 感染降低了 4 日龄幼虫营养代谢基因的表达,但增强了其先天性免疫相关基因的表达。

SBV 处理的预蛹体内营养代谢基因 *ilp*1 ($t=0.004$, $P=0.112$), *ilp*2 ($t=0.393$, $P=0.540$), *hex*110 ($t=0.374$, $P=0.640$), *hex70b* ($t=0.602$, $P=0.343$), *hex70c* ($t=0.585$, $P=0.427$)和 *vg* ($t=-0.091$, $P=0.929$)的表达量与对照组无显著差异(图 4：A)；先天性病毒免疫基因 *rel* ($t=-1.283$, $P=0.213$), *toll* ($t=-0.340$, $P=0.737$), *apidaecin* ($t=-0.188$, $P=0.853$), *abaecin* ($t=0.228$, $P=0.822$), *defensin* ($t=-0.876$, $P=0.390$), *hymenoptaecin* ($t=-1.050$, $P=0.305$), *jra* ($t=1.682$, $P=0.107$), *key* ($t=-0.332$, $P=0.742$)和 *state92e* ($t=0.309$, $P=0.760$)的表达量也无显著差异。但细胞凋亡基因 *atg*7 ($t=-2.417$, $P=0.026$)和 *LOC*100577876 ($t=-3.091$, $P=0.005$),以及抗 RNA 病毒基因 *dis*3 ($t=-2.241$, $P=0.037$)的表达量显著高于对照组(图 4：B)。因此,SBV 侵染引起变态期蜜蜂幼虫体内细胞凋亡和抗病毒基因表达量的显著增加。

接种 SBV 病毒的 10 日龄成虫体内的营养代谢基因 *ilp*1 ($t=-0.588$, $P=0.563$), *ilp*2 ($t=-0.608$, $P=0.550$), *hex*110 ($t=1.147$, $P=0.265$), *hex70b* ($t=-1.242$, $P=0.230$)和 *hex70c* ($t=1.041$, $P=0.312$)的表达量与对照组无显著差异；但 *vg* 的表达显著下调($t=3.943$, $P=0.001$)(图 5：A)。先天性病毒免疫基因 *rel* ($t=-2.091$, $P=0.055$), *toll* ($t=1.904$, $P=0.078$), *apidaecin* ($t=-0.309$, $P=0.762$), *abaecin* ($t=0.274$, $P=0.788$), *defensin* ($t=1.171$, $P=0.261$), *hymenoptaecin* ($t=-0.848$, $P=0.410$)和 *jra* ($t=-0.553$, $P=0.589$)的表达量也没有显著差异,*key* ($t=-3.419$, $P=0.004$)和 *state92e* ($t=-2.287$, $P=0.038$)的表达量显著增加；而凋亡基因 *LOC*100577876 ($t=-3.602$, $P=0.003$)和抗 RNA 病毒基因 *dicer* ($t=-2.967$, $P=0.010$) 在接种病

A

■ CK ▥ SBV

相对表达量 Relative expression level

1.0 0.0 −1.0 −2.0 −3.0 −4.0 −5.0 −6.0

*ilp*1 *ilp*2 *hex*110 *hex70b* *hex70c* *vg*

基因 Genes

B

■ CK ▥ SBV

相对表达量 Relative expression level

8.0 6.0 4.0 2.0 0.0 −2.0 −4.0

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

rel *toll* *apidaecin* *abaecin* *defensin* *hymenoptaecin* *jra* *key* *stae92e* *atg7* *LOC100577876* *dis3* *dicer*

先天性病毒免疫 Innate virus immunity

细胞凋亡 Apoptosis

抗RNA病毒 Anti-RNA virus

基因 Genes

图 3 SBV 侵染后中华蜜蜂 4 日龄幼虫体内营养代谢基因(A)以及先天性病毒免疫、细胞凋亡和抗 RNA 病毒基因(B)的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression levels of nutrient metabolism-related genes (A), and innate virus immunity, apoptosis and anti-RNA virus genes (B) in the 4-day-old larvae of *Apis cerana cerana* infected with SBV

图中数据以平均值 ± 标准误表示;星号表示基因表达量在 SBV 组与对照之间差异显著($P < 0.05$, T 检验),图 4 – 6 同。Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisk indicates significant difference in gene expression level between the SBV group and the control (CK) ($P < 0.05$, T-test). The same for Figs. 4 – 6.

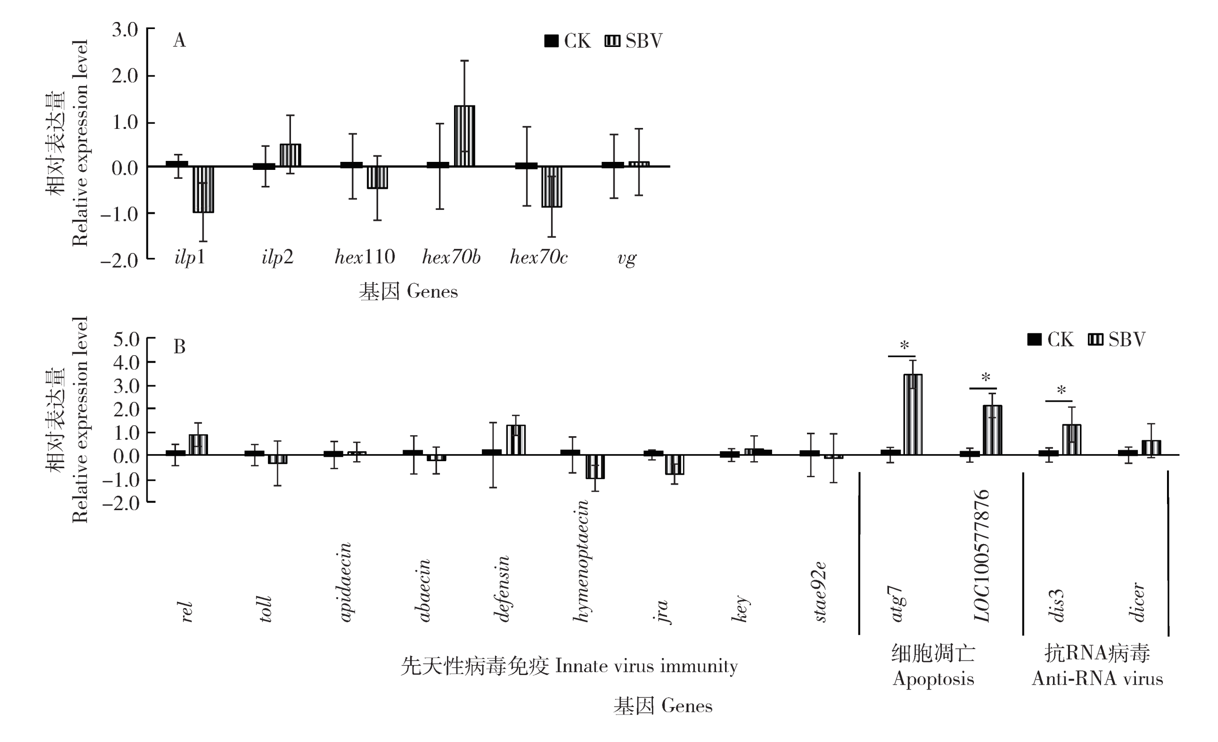


图 4 SBV 侵染后中华蜜蜂预蛹体内营养代谢基因(A)以及先天性病毒免疫、细胞凋亡和抗 RNA 病毒基因(B)的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression levels of nutrient metabolism-related genes (A), and innate virus immunity, apoptosis and anti-RNA virus genes (B) in prepupae of *Apis cerana cerana* infected with SBV

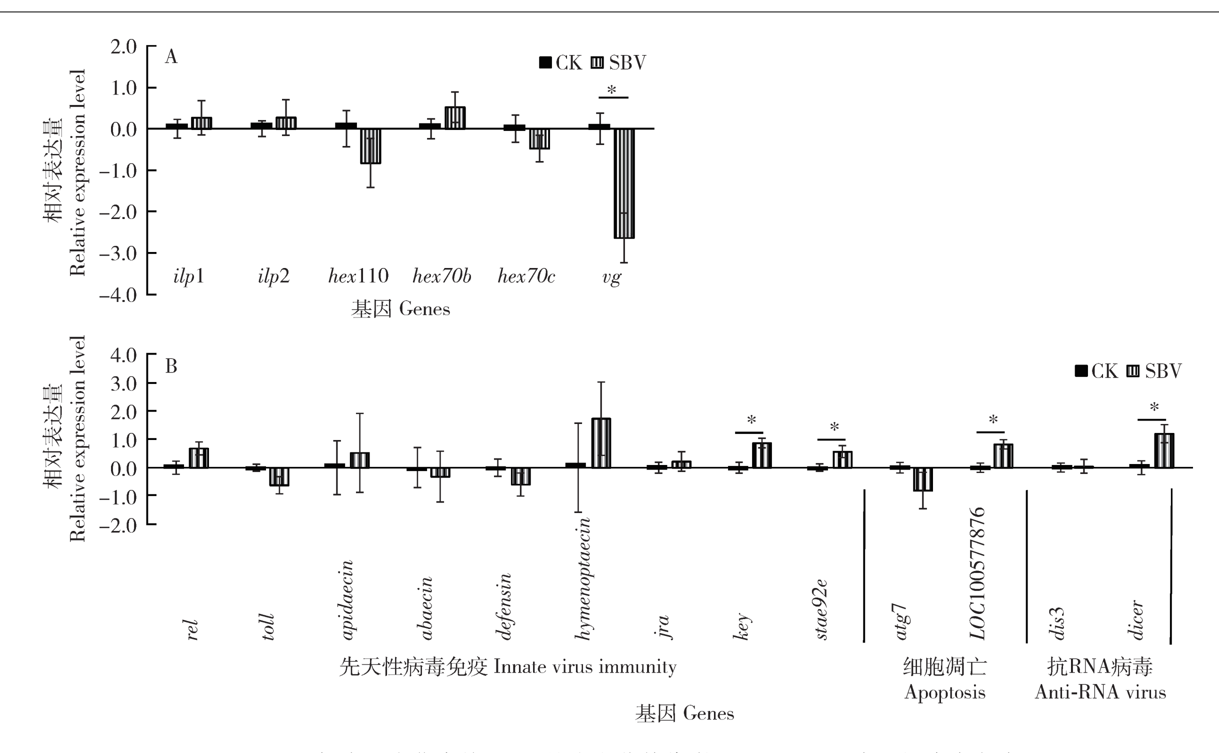


图 5　SBV 侵染后中华蜜蜂 10 日龄成虫营养代谢基因(A)以及先天性病毒免疫、细胞凋亡和抗 RNA 病毒基因(B)相对表达水平

Fig. 5　Relative expression levels of nutrient metabolism-related genes (A), and innate virus immunity, apoptosis and anti-RNA virus genes (B) in the 10-day-old adults of *Apis cerana cerana* infected with SBV

毒蜜蜂体内表达量显著增加(图 5：B)。由此可知，SBV 能降低 10 日龄成虫 *vg* 的表达量，也提高了部分免疫基因的表达水平。

SBV 侵染对 20 日龄成虫体内营养代谢基因 *ilp*1 (t = 1.517, P = 0.147), *ilp*2 (t = −0.541, P = 0.595), *hex70b* (t = −1.702, P = 0.106), *hex70c* (t = 1.258, P = 0.225)和 *vg* (t = −0.096, P = 0.924)的表达无显著影响(图 6：A)。先天性病毒免疫基因 *rel* (t = 387, P = 0.705), *apidaecin* (t = −0.275, P = 0.788), *hymenoptaecin* (t = −0.188, P = 0.843), *defensin* (t = 1.173, P = 0.260), *abaecin* (t = −0.029, P = 0.973), *jra* (t = 0.715, P = 0.486), *key* (t = 1.468, P = 0.164)和 *state92e* (t = 2.000, P = 0.065)的表达量也没有显著差异。细胞凋亡基因 *atg*7 (t = 1.079, P = 0.299)和 *LOC*100577876(t = 0.501, P = 0.624)与抗 RNA 病毒基因 *dis*3 (t = 1.171, P = 0.261)和 *dicer* (t = 0.429, P = 0.674)的表达也未受影响。但一个营养代谢基因 *hex*110(t = 2.757, P = 0.013)和一个先天性病毒免疫基因 *toll*(t = 2.865, P = 0.012)还是显著低表达(图 6：B)。所以，SBV 感染对老龄成虫的营养代谢和免疫水平也有负面的影响。

3　讨论

中华蜜蜂是我国特有的蜜蜂资源，是我国养蜂业的重要组成部分。但由 SBV 引起的蜜蜂囊状幼虫病是威胁中华蜜蜂生存的最主要病原因子，严重时可引起蜂群死亡(Shan *et al.*, 2017)。但对于该病毒通过什么机制给蜜蜂带来这么大的危害和影响至今还不是很清楚。营养和免疫是所有生物进行正常生命活动的基础，本研究对接种 SBV 的蜜蜂幼虫和成虫体内与营养和免疫相关基因表达水平进行检测，同时检测其生存曲线，综合研究 SBV 对蜜蜂影响的分子机制。结果显示，SBV 的侵染显著影响了各发育阶段中华蜜蜂的营养代谢；各阶段发育的蜜蜂也能够提高自身的免疫反应，应对 SBV 侵染；但 SBV 侵染的预蛹提高了细胞凋亡基因的表达水平，可能与染病幼虫的发育停滞和最终死亡有关。

作为蜜蜂特异性的病原微生物，SBV 对中华蜜蜂有较高的侵染能力和致病性。接种试验表明，无论中华蜜蜂的幼虫和成虫，接种后 SBV 均可在蜜蜂体内繁殖。所不同的是 SBV RNA 在中华蜜蜂幼虫和预蛹体内的表达量很高，而在成虫体内的表达量

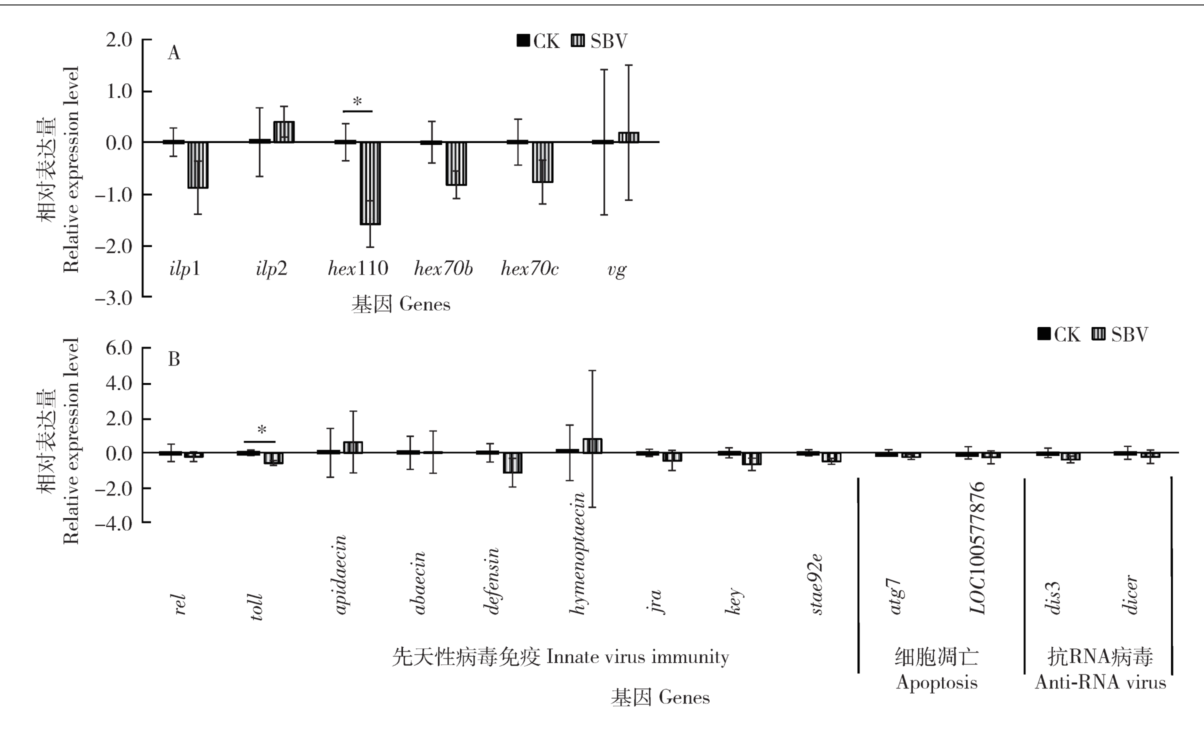


图 6 SBV 侵染后中华蜜蜂 20 日龄成虫营养代谢基因(A)以及先天性病毒免疫、细胞凋亡和抗 RNA 病毒基因(B)相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of nutrient metabolism-related genes (A), and innate virus immunity, apoptosis and anti-RNA virus genes (B) in the 20-day-old adults of *Apis cerana cerana* infected with SBV

相对而言则要少很多(图 2)。含有高表达量 SBV RNA 的幼虫比含有低表达量 SBV RNA 的成虫有着更高的死亡率(图 1),SBV 的感染水平与其毒性密切相关。这种状况与实际蜂群内的症状的是一致的。通常染病蜂群中绝大多数的幼虫被 SBV 感染,在发育至预蛹期的时候大量死亡,虫体内部充满富含病毒粒子的液化组织液(Grabensteiner *et al*., 2001)。而成虫体内,染病蜜蜂的症状不明显,只是有研究表明染病蜜蜂的寿命因感染而缩短(Tantillo *et al*., 2015)。

营养代谢是正常发育的基础。SBV 感染对蜜蜂营养代谢的影响之前还没有工作涉及。本研究发现 SBV 感染显著降低了幼虫营养代谢基因 *ilp*1, *ilp*2, *hex*110, *hex70b* 和 *hex70c* 等的表达量(图 3: A),也降低了成虫 *vg* (图 5: A)或者 *hex*110 (图 6: A)的表达量。该结果明确说明了 SBV 感染影响了蜜蜂幼虫和成虫的营养代谢。

先天性免疫是昆虫应对各病原侵染的主要机制。本研究发现,感染 SBV 的蜜蜂幼虫,涵盖主要免疫通道 IMD, Toll 和 JNK-State 的先天性病毒免疫基因 *rel*, *toll*, *apidaecin*, *hymenoptaecin*, *defensin*, *abaecin* 和 *jra* 的表达都显著上调 (图 3: B),在成虫期有 *key* 和 *stat92e* 的上调表达 (图 5: B)。这说明先天性免疫参与中华蜜蜂应对 SBV 侵染,但在幼虫和成虫之间参与的基因种类和多少有所差别,该结果与之前的研究基本一致(Shan *et al*., 2017)。同时,与 RNA 干涉相关的抗病毒机制也在早期成虫体内发挥着一定的作用。此外,细胞凋亡也是一种免疫机制,能够在细胞水平上将染病的细胞清除出去,避免相邻的其他正常细胞被侵染和死亡(Fadok and Henson, 1998; Marques and Imler, 2016; Nainu *et al*., 2017),本研究发现接种 SBV 的蜜蜂幼虫发育至预蛹期时发育停滞与死亡的现象可能与体内细胞凋亡基因 *atg*7 和 *LOC*100577876 的上调表达有关。这为后续 SBV 致死中华蜜蜂幼虫的机制研究提供了一个新的方向。

转录组测序是一种研究致病机制和宿主抗性的重要技术和手段,从中可以获得大量的与 SBV 侵染和蜜蜂抗性相关的信息。这需要较好的生物学信息学技术从海量信息中分析提炼。本研究依据模式生物果蝇的抗病毒相关基因,寻找蜜蜂体内的对应基因,检测其在抵抗 SBV 过程中的表达规律和机制,提高了筛选工作的可能性和效率,为相关研究和应用提供试验依据。无论是转录组测序的结果,或者是本研究获得的这些对营养和免疫影响的结果,都还需进一步的功能验证。这也是下一步工作的

方向。

SBV 是严重威胁中华蜜蜂生存的主要病原因子之一,但其致死原因和中华蜜蜂的应对机制不明。本研究证实 SBV 在中蜂幼虫体内的感染水平远远高于在成虫体内;其对幼虫致死,而对成虫影响则不显著;SBV 的感染显著影响了幼虫和成虫的营养代谢;幼虫和成虫均能够通过提高自身的免疫水平来应对 SBV 的感染,但预蛹期的细胞凋亡水平的增加可能与染病幼虫的发育停滞和死亡有关。这些结果为未来中华蜜蜂应对 SBV 侵染相关研究和应用提供了理论和实验上依据。

参考文献（References）

Aizen MA, Harder LD, 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.*, 19(11): 915–918.

Bailey L, Carpenter JM, Woods RD, 1982. A strain of sacbrood virus from *Apis cerana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 39(2): 264–265.

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera linnaeus*). *Virology*, 23(3): 425–429.

Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML, 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 10: 71–82.

Chen YP, Siede R, 2007. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.*, 70(1): 33–80.

Choe SE, Nguyen LT, Noh JH, Koh HB, Jean YH, Kweon CH, Kang SW, 2012. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(3): 330–333.

de Azevedo SV, Hartfelder K, 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development-differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 1064–1071.

Doublet V, Poeschl Y, Gogol-Döring A, Alaux C, Annoscia D, Aurori C, Barribeau SM, Bedoya-Reina OC, Brown MJF, Bull JC, Flenniken ML, Galbraith DA, Genersch E, Gisder S, Grosse I, Holt HL, Hultmark D, Lattorff HM, Le Conte Y, Manfredini F, McMahon DP, Moritz RF, Nazzi F, Niño EL, Nowick K, van Rij RP, Paxton RJ, Grozinger CM, 2017. Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, 18(1): 207.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang HB, Kanost MR, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 645–656.

Fadok VA, Henson PM, 1998. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr. Biol.*, 8(19): R693–R695.

Galbraith DA, Fuller ZL, Ray AM, Brockmann A, Frazier M, Gikungu MW, Martinez JFI, Kapheim KM, Kerby JT, Kocher SD, Losyev O, Muli E, Patch HM, Rosa C, Sakamoto JM, Stanley S, Vaudo AD, Grozinger CM, 2018. Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics. *Sci. Rep.*, 8(1): 8879.

Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, Nowotny N, 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(1): 93–104.

Levy S, 2011. The pollinator crisis: what's best for bees. *Nature*, 479(7372): 164–165.

Lin L, Huang W, Chen Q, Guo S, Zhao C, Lei S, Su S, Li J, Huang S, 2016. Establishment of duplex PCR rapid detection method for CSBV and *Nosema ceranae* in *Apis cerana cerana*. *China Sciencepaper*, 11(18): 2100–2104. [林丽花, 黄伟峰, 陈琼艳, 郭少娟, 赵翠霞, 雷珊珊, 苏松坤, 李继莲, 黄少康, 2016. 二重 PCR 快速检测中蜂囊状幼虫病病毒与东方蜜蜂微孢子虫方法的建立. 中国科技论文, 11(18): 2100–2104]

Ma MX, Cheng J, Yang S, Wang S, Li P, 2011. Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comp. Funct. Genomics*, 2011(3): 409386.

Marques JT, Imler JL, 2016. The diversity of insect antiviral immunity: insights from viruses. *Curr. Opin. Microbiol.*, 32: 71–76.

McMahon DP, Natsopoulou ME, Doublet V, Fürst M, Weging S, Brown MJ, Gogol-Döring A, Paxton RJ, 2016. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc. Biol. Sci.*, 283(1833): 20160811.

McMenamin AJ, Daughenbaugh KF, Parekh F, Pizzorno MC, Flenniken ML, 2018. Honey bee and bumble bee antiviral defense. *Viruses*, 10(8): 395.

Nainu F, Shiratsuchi A, Nakanishi Y, 2017. Induction of apoptosis and subsequent phagocytosis of virus-infected cells as an antiviral mechanism. *Front. Immunol.*, 8: 1220.

Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Frey E, Rosenkranz P, Paxton RJ, 2017. The virulent, emerging genotype B of *Deformed wing virus* is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Sci. Rep.*, 7(1): 5242.

NBIT System, 2016. Research on Sustainable Development Strategy of Modern Agricultural Industry in China: Bee Catalogue. China Agriculture Press, Beijing. 289 pp. [国家蜂产业技术体系, 2016. 中国现代农业产业可持续发展战略研究: 蜂业分册. 北京: 中国农业出版社. 289 页]

Nguyen NT, Le TH, 2013. Complete genome sequence of sacbrood virus strain SBM2, isolated from the honeybee *Apis cerana* in Vietnam. *Genome Announc.*, 1(1): e00076-12.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25(6): 345–353.

Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ, 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632): 220–229.

Rana BS, Garg ID, Khurana SMP, Verma LR, Agrawal HO, 1986. Thai sacbrood virus of honeybees (*Apis cerana indica* F) in north-west Himalayas. *Indian J. Virol.*, 2: 127 – 131.

Rao KM, Katna S, Rana BS, Rana R, 2016. Thai sacbrood and sacbrood viruses versus European foulbrood of hive bees in India – a review. *J. Apic. Res.*, 54(3): 192 – 199.

Schwarz RS, Moran NA, Evans JD, 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(33): 9345 – 9350.

Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, Pecoraro MR, 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J. Virol. Methods*, 194(1 – 2): 102 – 106.

Shan L, Liuhao W, Jun G, Yujie T, Yanping C, Jie W, Jilian L, 2017. Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 150: 63 – 69.

Simone M, Evans JD, Spivak M, 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63(11): 3016 – 3022.

Tantillo G, Bottaro M, Di Pinto A, Martella V, Di Pinto P, Terio V, 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Ital. J. Food Saf.*, 4(3): 5364.

Verma LR, Rana BS, Verma S, 1990. Observations on *Apis cerana* colonies surviving from Thai Sacbrood Virus infestation. *Apidologie*, 21(3): 169 – 174.

White GF, 1913. Sacbrood, a disease of bees. U. S. D. A., Bureau of Entomology, Circular No. 169, New York. 1 – 5.

Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S, 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(12): 1842 – 1847.

Zhang J, Feng J, Liang Y, Chen D, Zhou ZH, Zhang Q, Lu X, 2001. Three-dimensional structure of the Chinese sacbrood bee virus. *Sci. China C Life Sci.*, 44(4): 443 – 448.

（责任编辑：马丽萍）